植 物 分 类 学 报 45 (6): 828–840(2007) doi:10.1360/aps07001
Acta Phytotaxonomica Sinica http://www.plantsystematics.com

中国沿海甲藻两个新记录属——舻杆藻属和易碎藻属

[1,2]顾海峰* [3]王 艳

[1](中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

[2](国家海洋局第三海洋研究所海洋地质和环境开放实验室 厦门 361005)

[3](暨南大学理工学院环境工程系 广州 510632)

The first record of *Ensiculifera* Balech and *Fragilidium* Balech (Dinophyceae) from Chinese coast

[1,2]GU Hai-Feng* [3]WANG Yan

[1] (*College of Marine Biology, Ocean University of China*, Qingdao 266003, China)

[2] (*Department of Geology and Environment, Third Institute of Oceanography*, Xiamen 361005, China)

[3](*Department of Environmental Engineering, College of Science & Engineering, Jinan University*, Guangzhou 510632, China)

Abstract Resting cysts and vegetative cells of *Ensiculifera* Balech and *Fragilidium* Balech have never been reported in China Sea. Such kinds of cysts were collected in the East China Sea and were allowed to germinate. The cyst of *Ensiculifera* sp. is spherical with a diameter of 22 μm. The cyst consists of two layers and is full of greenish granules, with a bright red body inside. The cyst wall is covered with short organic spines (2 μm long). The cell of *Ensiculifera* sp. comprises a conical epitheca and a rounded hypotheca, with the dimension of 17.7 μm long and 12.5 μm wide on the average. The plate pattern is po, x, 4′, 3a, 7″, 5c, 4s, 5‴, 2⁗. The cysts of *Fragilidium mexicanum* Balech are spherical with the diameter ranging from 54–60 μm. They are full of pale white granules and brown protoplasm, with a bright yellow body present. The archeopyle is spherical. The cells of *F. mexicanum* are 45.3 μm long and 42.8 μm wide, with the plate formula of po, 5′, 7″, 10c, 7s, 7‴, 2⁗, 1P. The cyst of *Fragilidium* sp. is also spherical with a diameter of 45 μm, which is similar to that of *F. mexicanum* except that the yellow body is not present. The cells of *Fragilidium* sp. are 41.6 μm long and 35.3 μm wide with the plate formula of po, 5′, 7″, 7‴, 2⁗, 1P. The Internal Transcribed Spacers (ITS) of *Ensiculifera* sp. and the small subunit (18S) rDNA of *Fragilidium* spp. were amplified and sequenced. Their phylogenetic positions agree with the morphological taxonomy.

Key words *Ensiculifera*, *Fragilidium*, *Fragilidium mexicanum*, dinoflagellate, cyst, China Sea.

摘要 舻杆藻属*Ensiculifera* Balech和易碎藻属*Fragilidium* Balech的营养细胞和孢囊在中国沿海还未被记录过, 作者在中国东海发现了它们的孢囊并通过萌发建立了株系, 在光镜和电镜下研究了其细胞形态。一种舻杆藻的孢囊为圆形, 直径22 μm, 双层壁, 孢囊体内充满淡绿色的颗粒, 有一个鲜艳的红色体, 孢囊外壁覆盖着2 μm长的有机质短刺; 营养细胞上壳圆锥形, 下壳圆形, 细胞平均长17.7 μm, 宽12.5 μm, 甲板方程式为po, x, 4′, 3a, 7″, 5c, 4s, 5‴, 2⁗。墨西哥易碎藻*Fragilidium mexicanum* Balech的孢囊为圆形, 直径54–60 μm, 孢囊内充满淡白色的颗粒物以及淡褐色的原生质体, 有一个鲜艳的黄色体, 萌发孔圆形, 偏在孢囊的一侧; 营养细胞平均长45.3 μm, 宽42.8 μm, 甲板方程式po, 5′ , 7″, 10c, 7s, 7‴,

---

2007-01-04 收稿, 2007-04-16 收修改稿。

基金项目: 国家自然科学基金(40476053; 30670156)资助(Supported by the National Natural Science Foundation of China, Grant Nos. 40476053, 30670156)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: haifenggu@yahoo.com)。

2'''', 1P。一种易碎藻的孢囊为圆形, 直径45 μm, 孢囊内充满淡白色的颗粒物以及淡褐色的原生质体, 黄色体不明显, 细胞壁较厚, 2–3 μm, 无色, 萌发孔圆形, 偏在孢囊的一侧。细胞平均长41.6 μm, 宽35.3 μm, 甲板方程式po, 5' , 7'', 7''', 2'''', 1P。对该种艉杆藻的转录间隔区(ITS)、2种易碎藻的小亚基(18S)序列进行了测定并建立了系统发育树, 它们的系统发育位置和形态学分类相吻合。
关键词　艉杆藻属; 易碎藻属; 墨西哥易碎藻; 甲藻; 孢囊; 中国沿海

很多甲藻在其生活史的某个阶段以休眠孢囊的形式存在, 其比例大约是甲藻总数的10%。绝大多数甲藻都是单倍体, 在某些环境因子的诱导下, 细胞会转化成配子, 两个配子结合后形成二倍体的合子, 合子可以直接进行减数分裂回到单倍体的细胞(Figueroa & Bravo, 2005), 但多数情况下它们会形成休眠孢囊(resting cyst), 并沉降到沉积物中。孢囊需要度过长度不等的休眠期, 在此期间无论条件如何它们都不会萌发。只有在度过了休眠期后, 并具备适宜的环境条件(通常为光照、氧气和合适的温度)(Anderson et al., 1987)孢囊才会萌发, 并通过减数分裂回到单倍体的细胞。甲藻孢囊可以在海底存活数十年, 因此沉积物中的孢囊反映了过去几年水体中甲藻出现的记录。甲藻孢囊根据细胞壁的组成可以分成两类, 第一类具有和孢粉类似的有机质细胞壁, 称为有机质孢囊; 第二类具有碳酸钙结晶形成的细胞壁, 称为钙质孢囊。产生钙质孢囊的种类都被划分在钙甲藻亚科Calciodinellaceae下, 该亚科包括斯氏藻属*Scrippsiella* Balech ex Loeblich III和艉杆藻属*Ensiculifera* Balech以及一些根据孢囊定义的属(比如*Calcigonellum* Deflandre、*Calciodinellum* Deflandre等)(Fensome et al., 1993; Montresor et al., 1997; Meier et al., 2002)。钙甲藻亚科下也有一些种类产生有机质的而不是钙质的孢囊(如汉高斯氏藻*Scrippsiella hangoei* (Schiller) Larsen、伊玛艉杆藻*Ensiculifera imariensis* Kobayashi & Matsuoka)。我们发现了艉杆藻属产生的一个有机质孢囊, 并根据萌发获得的细胞形态进行了验证。易碎藻属*Fragilidium* Balech属于Helgolandinioideae亚科(Fensome et al., 1993), 就像其名字暗示的那样, 该类甲藻的甲板脱落后很容易断裂。易碎藻属和艉杆藻属下已经描述的种类都只有5种, 它们的细胞分布情况很少报道, 可能与细胞较小或固定后容易破碎有关, 但是易碎藻属的孢囊却在很多海域被发现(Owen & Norris, 1985; Blanco, 1989; Sonneman & Hill, 1997; Orlova et al., 2004)。

易碎藻属和艉杆藻属的营养细胞至今在中国沿海水体中未被记录, 此前在东海甲藻孢囊的研究中也没有被报道(Qi et al., 1996; Cho & Matsuoka, 2001; 王朝晖, 齐雨藻, 2003; 顾海峰等, 2004), 我们通过萌发试验得到了多株细胞, 对其甲板进行了观察, 并测定了其分子序列, 系统发育结果和形态学分类相吻合, 本研究的结果有助于全面了解中国海区的甲藻多样性。

1　材料和方法

1.1　样品的采集和处理

样品在2002年11月和2005年3月采集于东海的两个站位(122°30.64′ E, 29°0.01′ N; 121°25.54′ E, 27°12.46′ N), 取表层沉积物, 在4 ℃条件下保存。称量5 g样品与灭菌海水混匀, 超声波处理2 min (100 W), 100和15 μm筛绢过滤, 取留在15 μm 筛绢上的样品在

Olympus显微镜下对孢囊进行鉴定(100×)。另外用微细玻璃管分离活体孢囊到装有不加硅的f/2培养液(Guillard & Ryther, 1962)的96孔细胞培养板进行孵化(20 ℃, 3000 lx, 12 h光: 12 h黑暗)。

1.2 藻细胞的形态观察

萌发所得的藻类细胞用2%甲醛固定、calcofluor染色(Fritz & Triemer, 1985), 在Olympus (BX51, 东京, 日本)荧光显微镜下观察甲板组成。离心收集指数期的细胞, 用终浓度2%的戊二醛固定。细胞在系列酒精中脱水, 临界点干燥, 喷金, 在Leo1530扫描电子显微镜下观察和照相。

1.3 DNA提取、PCR扩增和测序

离心收集100 mL细胞, 用UNIQ柱式植物基因组提取试剂盒(上海生工)提取DNA; 5.8S和转录间隔区(ITS1、ITS2)用引物ITS1和ITS4 (White et al., 1990)扩增。18S rDNA用一对真核生物通用引物5'-CGAATTCAACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'和5'-CCGGAT-CCTGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3'扩增。PCR反应体积为50 μL, 包括5 U *Taq* (Takara), 250 μmol/L dNTP, 1×PCR buffer, 2 mmol/L $MgCl_2$, 100 pmol引物, 以及1–10 ng模板DNA。PCR程序为: 94 ℃变性4 min, 然后开始25次循环，即94 ℃变性1 min, 50 ℃退火2 min, 72 ℃延伸3 min, 最后72 ℃延伸7 min。PCR产物在2.0%琼脂糖凝胶电泳, 1% EB染色, 紫外光下检测。PCR产物直接送上海生工测序。

1.4 系统发育分析

序列用 CLUSTAL X程序(Thompson et al., 1997)进行多重比对。系统发育利用MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004)进行最大简约法(Maximum parsimony)分析。

2 结果

2.1 形态学

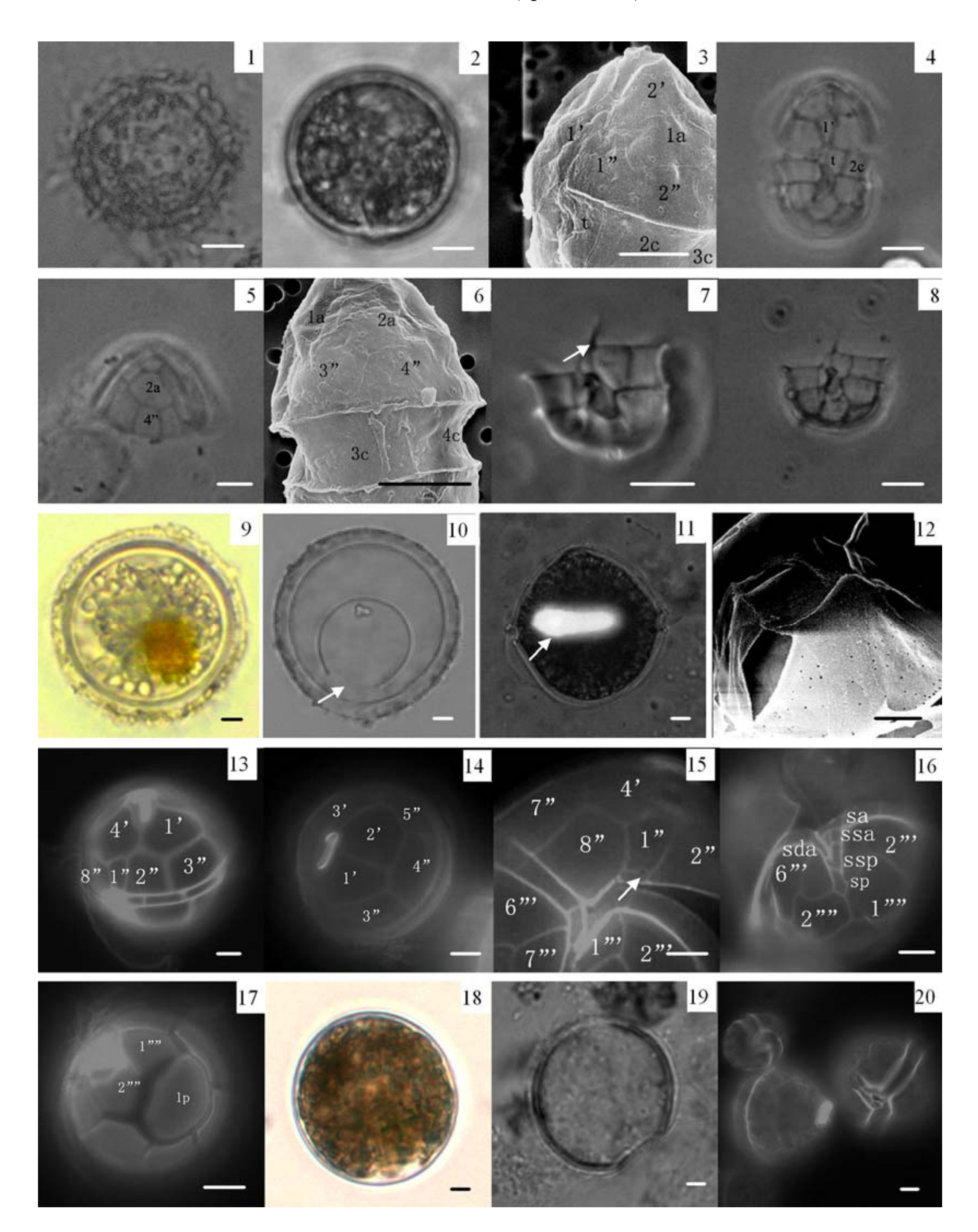
2.1.1 一种艉杆藻(SSND22) 孢囊形态: 孢囊圆形, 直径22 μm, 双层壁, 孢囊体内充满淡绿色的颗粒, 一个鲜艳的红色体清晰可见。孢囊外壁密密地覆盖着2 μm长的圆柱形短刺, 刺的远端封闭(图1), 萌发孔不清楚。我们仅发现了该种的一个孢囊。在培养条件下

→

图1–8 艉杆藻的细胞和孢囊(图4、6是电镜照片, 其余均为光镜照片) **1.** 沉积物中的空壳孢囊, 示有机质的刺。**2.** 培养物中的活体孢囊。**3.** 细胞甲板, 侧面观。**4.** 细胞甲板, 腹面观。**5, 6.** 细胞甲板，背面观。**7.** 细胞下鞘甲板, 示过渡板上的刺(箭头)。**8.** 细胞下鞘甲板, 示纵沟板。**图9–17** 墨西哥易碎藻的细胞和孢囊(图12是电镜照片, 其余均为光镜照片) **9.** 沉积物中的活体孢囊, 示黄色体。**10.** 空壳孢囊, 示萌发孔(箭头)。**11.** 活体细胞, 示细胞核(箭头)。**12.** 活体细胞, 示表面结构。**13.** 细胞甲板, 侧面观。**14.** 细胞甲板, 顶面观。**15.** 细胞甲板, 腹面观, 示第一沟前板及腹孔(箭头)。**16.** 细胞甲板, 示纵沟板。**17.** 细胞甲板, 底面观。 **图18–20** 易碎藻的细胞和孢囊(光镜) **18.** 培养物中的活体孢囊。**19.** 培养物中的空壳孢囊。**20.** 三个不同大小的细胞。

Figs. 1–8. The cell and cyst of *Ensiculifera* sp. (Figs. 4, 6 are SEM and others are LM). **1.** An empty cyst from the field, showing the organic spines. **2.** A living cyst in culture. **3.** Thecal plates, lateral view. **4.** Thecal plates, ventral view. **5, 6.** Thecal plates, dorsal view. **7.** Hypotheca, showing the spine of t plate (arrow). **8.** Hypotheca, showing the sulcal plates. **Figs. 9–17.** The cell and cyst of *Fragilidium mexicanum* (Fig. 12 is SEM and others are LM). **9.** A living cyst from the field showing the yellow accumulation body. **10.** An empty resting cyst showing the archeopyle (arrow). **11.** A vegetative cell showing the nucleus (arrow). **12.** A motile cell showing the surface of theca. **13.** Thecal plates, lateral view. **14.** Thecal plates, apical view. **15.** Thecal plates, ventral view showing the first precingular plate and the ventral pore (arrow). **16.** Sulcal plates. **17.** Thecal plates, antapical view. **Figs. 18–20.** The cell and cyst of *Fragilidium* sp. (LM). **18.** A living cyst of *Fragilidium* sp. in culture. **19.** An empty cyst of *Fragilidium* sp. in culture. **20.** Three cells of different sizes.
Scale bar=5μm.

该种形成表面光滑的孢囊(图2)。营养细胞形态: 营养细胞上壳圆锥形, 下壳圆形, 比上壳短。细胞长15–22.5 μm (平均17.7 μm, *n*=17), 宽10–15 μm (平均12.5 μm, *n*=17)。甲板方程式为po, x, 4′, 3a, 7″, 5c, 4s, 5‴, 2⁗。细胞核圆形, 位于细胞中央。顶孔复合体有一个圆形的顶孔, 向上略微延伸形成一个不明显的顶角(apical horn), 顶孔和1′通过一个长长的导



沟板(canal plate)相连(图3)。1′菱形, 较窄, 左右对称(图4)。细胞背面有三块前间插板, 第一和第三前间插板(1a, 3a)都是五边形, 第二前间插板(2a)为六边形, 2a比1a和3a要大(图5, 6)。横沟略微下陷, 左旋, 偏移距离约为横沟高的一半, 第一横沟板和纵沟前板相接处有一根长度和横沟高度相近的刺(图7)。横沟板5块, 第一横沟板很窄, 可以认为是过渡板(t)。纵沟板5块, 包括纵沟前板(sa)、左纵沟板(sl)、右纵沟板(sr)、纵沟间板(sm)和后纵沟板(sp)。sm很小, 位于sl、sr和sp中间。sp和t板没有直接接触(图8)。

2.1.2 墨西哥易碎藻 孢囊形态: 孢囊圆形, 直径54–60 μm, 孢囊外壁有一圈很厚的胶质物, 孢囊内充满淡白色的颗粒物以及淡褐色的原生质体, 有一个鲜艳的黄色体清晰可见(图9), 细胞壁很厚, 3–4 μm, 无色, 壁上有颗粒性物质, 萌发孔大, 圆形, 偏在孢囊的一侧(图10)。这种类型的孢囊是东海的常见种, 最大密度达到7.4个/g, 我们总共萌发了5个类似的孢囊, 均得到同一种细胞。营养细胞形态: 细胞一般单个生活, 但有时会排列成链状, 可能是刚刚分裂完毕的2个子细胞。上壳呈圆锥形, 下壳半圆形, 左右不对称, 比上壳长。细胞核长而粗, 位于细胞中央(图11)。细胞长32–57 μm, 宽30–55 μm (平均长45.3 μm, 宽42.8 μm, *n*=12), 甲板很薄, 在电镜下可见上面密布着小孔(图12)。甲板方程式为po, 5′ , 7″, 10c, 8s, 7‴, 2⁗, 1P。顶孔复合体由一块三角形的甲板和一个耳朵状的顶孔组成(图13, 14), 1′六边形, 较其他顶板要小, 2′五边形, 3′六边形, 比2′略大一点, 4′七边形, 是所有顶板中最大的一块; 1″四边形, 和顶孔复合体通过两条垂直的线连接, 是所有沟前板中最小的, 板的下方伸出一条平行于横沟的裂缝, 末端膨胀成一个圆孔(图15)。横沟略微下陷, 左旋, 偏移距离和横沟的高度相当。纵沟板7块, 分别是纵沟前板(sa), 右纵沟前板(sda), 左纵沟前板(ssa), 中间纵沟前板(sma), 左纵沟后板(ssp), 右纵沟后板(sdp), 纵沟后板(sp)(图16)。1‴和7‴都是五边形, 它们比其他的沟后板要小很多。1⁗和2⁗均为五边形, 但形态和大小都不同, 1P板很大, 约等于1⁗和2⁗的面积之和(图17)。

2.1.3 一种易碎藻(G02) 孢囊形态: 孢囊圆形, 直径45 μm, 孢囊外壁无胶质物, 孢囊内充满淡白色的颗粒物以及淡褐色的原生质体, 没有黄色体(图18), 细胞壁较厚, 2–3 μm, 无色, 萌发孔在孢囊的一侧, 圆形(图19)。该种孢囊密度较小, 仅成功萌发了一个。营养细胞形态: 细胞上壳呈圆锥形, 下壳半圆形(图20), 细胞核长而粗, 位于细胞中央, 细胞长25–52 μm, 宽22–48 μm (平均长41.6 μm, 宽35.3 μm, *n*=10)。甲板方程式为po, 5′ , 7″, 7‴, 2⁗, 1P。顶孔复合体由一块三角形的甲板和一个耳朵状的顶孔组成, 1′七边形, 2′五边形, 3′和4′均为六边形。1″五边形, 远远小于其他的沟前板, 和顶孔复合体通过一条直线连接, 板的下方伸出一条平行于横沟的裂缝, 末端膨胀成一个圆孔; 横沟略微下陷, 左旋, 偏移距离和横沟的高度相当。1⁗和2⁗均为五边形, 但形态和大小都有差别。1P板很大, 约等于1⁗和2⁗的面积之和。该种细胞的甲板很薄, 难以得到清晰的照片。

2.2 系统发育分析

对1株舭杆藻(SSND22)进行了转录间隔区(ITS)序列的测定, 这是因为钙甲藻亚科在基因库中有丰富的该片段的序列, 而其他的片段, 比如小亚基(18S), 可得到的数量很少。结果表明舭杆藻的ITS1长197 bp, ITS2长201 bp, 它和伊玛舭杆藻(D207)的相似性为84.21%, 但是和代尔五隔藻*Pentapharsodinium dalei* Indelicato & Loeblich的相似性却达

表1 系统发育分析所用到的种类、株系、基因号和参考文献
Table 1 Species name, strains, their GenBank accession number and reference in the phylogenetic analysis

种类 Taxon	株系 Strain	基因号 GenBank No.	参考文献 Reference
Calciodinellum albatrosianum (Kamptner) Janofske & Karwath	M34-17	AY676144	Gottschling et al., 2005b
C. levantinum Meier, Janofske & Willems	GeoB122	AY676146	Gottschling et al., 2005b
C. operosum Deflandre	SZN74	AY327462	Gottschling & Plotner, 2004
Calcigonellum infula Deflandre	SZN62	AF167387-88	D’Onofrio et al., 1999
Ensiculifera cf. *imariensis* Kobayashi & Matsuoka	JB3	AF167379-80	D’Onofrio et al., 1999
E. aff. *imariensis* Kobayashi & Matsuoka	D207	AY728076	Gottschling et al., 2005a
E. loeblichii Cox & Arnott	UTEX LB1595	AF167373-74	D’Onofrio et al., 1999
E. aff. *loeblichii* Cox & Arnott	GeoB220	AY499513	Gottschling et al., 2005a
Ensiculifera sp.	SSND22		this study
Pentapharsodinium tyrrhenicum (Balech) Montresor, Zingone & Marino	SZN13	AF167375-76	D’Onofrio et al., 1999
P. tyrrhenicum	GeoB229	AY499512	Gottschling et al., 2005a
P. dalei Indelicato & Loeblich III	SZN19	AF527817	Montresor,M. et al., 2003
Scrippsiella hangoei (Schiller) Larsen	SHTV1	AY499515	Gottschling et al., 2005a
S. lachrymosa Lewis	SZN75	AF167389	D’Onofrio et al., 1999
S. lachrymosa	IO25-01	AY676150	Gottschling et al., 2005a
S. precaria Montresor & Zingone	CS-294	AY499518	Gottschling et al., 2005a
S. ramonii Montresor	SZN7	AF167381	D’Onofrio et al., 1999
S. rotunda Lewis	SSND11		this study, with the same sequence as AF167385
S. rotunda	GeoB280	AY788355	Gottschling et al., 2005b
S. rotunda	SZN66	AF167385	D’Onofrio et al., 1999
S. sweeneyae Balech ex Loeblich III	CCCM 280	AY499528	Gottschling et al., 2005a
S. sweeneyae	NIES684	AY499520	Gottschling et al., 2005a
S. trifida Lewis	GeoB109	AY499521	Gottschling et al., 2005a
S. trochoidea (Stein) Loeblich III	GeoB140	AY676152	Gottschling et al., 2005b
S. trochoidea	GeoB188	AY499524	Gottschling et al., 2005a
S. trochoidea	GeoB201	AY676158	Gottschling et al., 2005b
S. trochoidea	GeoB210	AY676159	Gottschling et al., 2005b
S. trochoidea	GeoB214	AY676160	Gottschling et al., 2005b
S. trochoidea	GeoB251	AY788358	Gottschling et al., 2005b
S. trochoidea	SZN77	AF527096	Montresor et al., 2003
S. trochoidea	SZN90	AF527109	Montresor et al., 2003
S. trochoidea var. *aciculifera* Montresor	GeoB160	AY499526	Gottschling et al., 2005a
S. trochoidea var. *aciculifera*	SCCAP499	AF527066	Montresor M. et al., 2003
S. trochoidea var. *aciculifera*	SZN60	AF167391	D’Onofrio et al., 1999

到了88.47%。对该株艉杆藻以及来自基因库中的序列(表1)进行了最大简约法分析，建立了系统发育树，2株伊玛艉杆藻和本株艉杆藻聚合在一起，支持度达到89%，代尔五隔藻是距离它们最近的一个种，支持度为85%，特里五隔藻*Pentapharsodinium tyrrhenicum* (Balech) Montresor, Zingone & Marino和它们共同组成了一个类群，支持度为84%，艉杆藻属的另一个种——*Ensiculifera loeblichii* Cox & Arnott，是距离这个类群最近的。斯氏藻属、*Calcigonellum*和*Calciodinellum*的种类组成了另一个类群，支持度达到99%。这两个类群互为姐妹组，支持度达到100% (图21)。

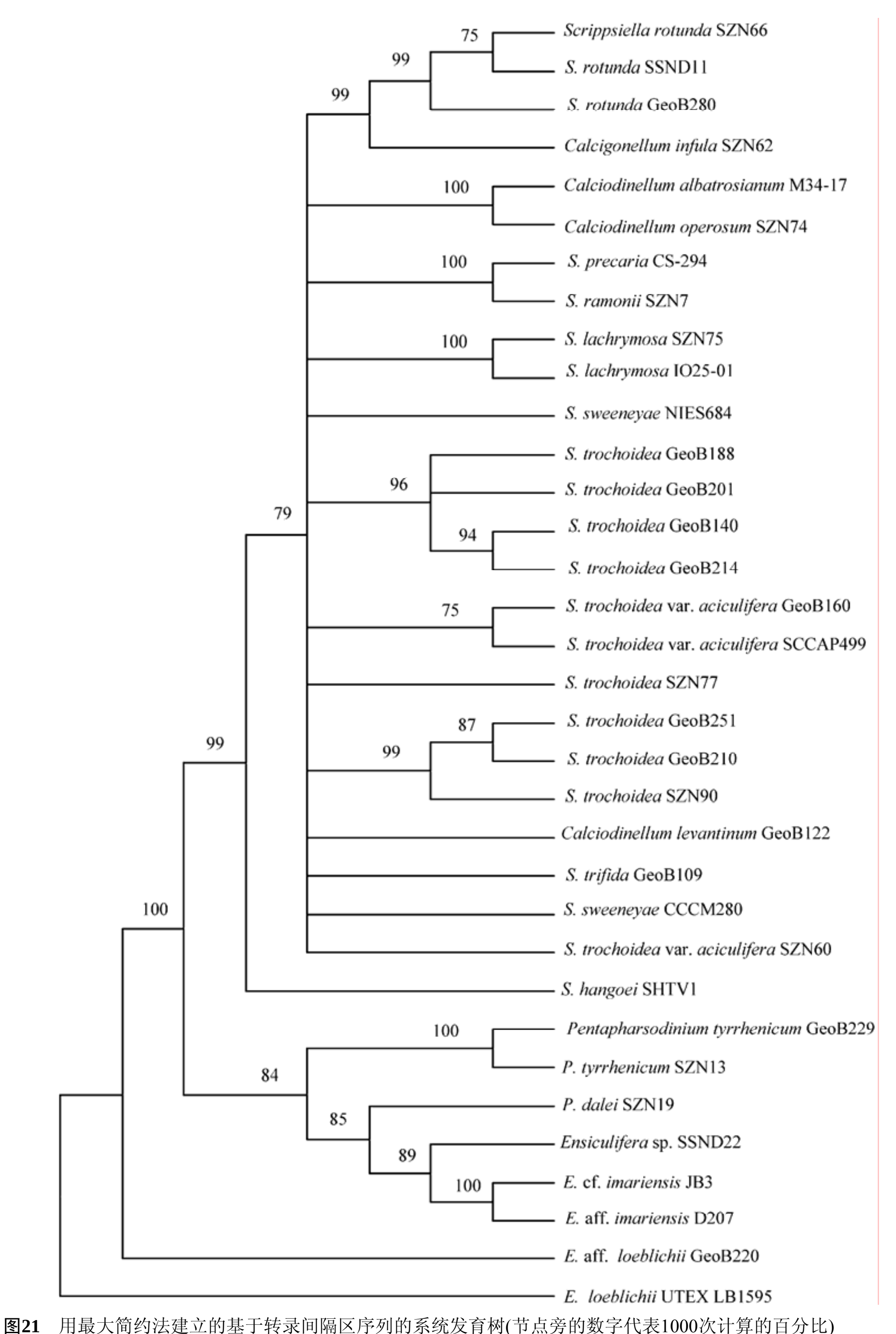


图21 用最大简约法建立的基于转录间隔区序列的系统发育树(节点旁的数字代表1000次计算的百分比)

Fig. 21. Maximum parsimony consensus tree resolved from ITS-5.8S rDNA nucleotide sequences (Numbers next to branching points indicate percentage of 1000 bootstraps).

两株墨西哥易碎藻的18S序列完全一致，它们和半球易碎藻*Fragilidium subglobosum* (Stosch) Loeblich III的相似性为93.77%，和未定种的易碎藻*Fragilidium* sp. G02的相似性为92.74%；该株易碎藻和半球易碎藻的相似性为92.81%。对两株易碎藻以及来自基因库中的序列(表2)进行了最大简约法分析，建立了系统发育树。墨西哥易碎藻和半球易碎藻聚合在一起，支持度达到91%，夜光梨甲藻*Pyrocystis noctiluca* Murray ex Haeckel和新月梨甲藻*Pyrocystis lunula* Schütt组成了一个类群，支持度达到99%，该易碎藻是它们的子树，这3个种组成了一个类群，但支持度只有50%，这5个种组成一个支持度达到100%的类群，但是和其他种类都相差较远(图22)。

表2　系统发育分析所用到的种类、株系、基因号和参考文献

Table 2　Species name, strains, their GenBank accession number and reference in the phylogenetic analysis

种类 Taxon	株系 Strain	基因号 GenBank No.	参考文献 Reference
Adenoides eludens (Herdman) Balech	CCCM683	AF274249	Saldarriaga et al., 2001
Alexandrium affine (Inoue & Fukuyo) Balech	AFF37	AB088282	Kim et al., 2002
A. catenella (Whedon & Kofoid) Balech	DPC8	AB088288	Kim et al., 2002
A. minutum Halim	SZN30	AJ535380	John et al., 2003
Ceratium furca (Ehrenberg) Claparede & Lachmann		AJ276699	Zhuang et al., 2000
C. fusus (Ehrenberg) Dujardin	CCMP154	AF022153	Saunders et al., 1997
C. longipes (Bailey) Gran	CCMP1770	DQ388462	Lin et al., 2006
Ceratocorys horrida Stein	CCMP157	AF022154	Saunders et al., 1997
Crypthecodinium cohnii Biecheler		DQ241737	Ren et al., 2005
Crypthecodinium sp.	CAAE-CI2	DQ322643	Parrow et al., 2006
Cryptoperidiniopsis brodyi Stein	CBDE10	DQ991374	Park et al., 2006
Fragilidium mexicanum Balech	FSND01		this study
F. subglobosum (Stosch) Loeblich III		AF033869	Walsh et al., 1997
Fragilidium sp.	G02		this study
Gonyaulax cochlea Meunier	CCMP1592	AF274258	Saldarriaga et al., 2001
G. polygramma Stein		AJ833631	Jeong et al., 2004
G. spinifera (Claparede & lachmann) Diesing	GSTL1	AF052190	Usurp et al., 1998
Gymnodinium sp.	MUCC284	AF022196	Saunders et al., 1997
Karenia brevis (Davis) Hansen & Moestrup		AJ415518	Shalchian et al., 2001
Lingulodinium polyedrum (Stein) Dodge	CCCM202	AF274269	Saldarriaga et al., 2001
Ostreopsis cf. *ovata* Fukuyo		AF244939	Pin et al., 2001
Peridinium willei Hultfeld-Kaas		AB232669	Takano & Horiguchi, 2006
Pfiesteria piscide Steidinger & Burkholder	PPMS0507	AM231033	Jeong et al., 2006
Protoceratium reticulatum (Claparede & lachmann) Bütschli	CCCM535	AF274273	Saldarriaga et al., 2001
Pyrocystis lunula Schütt	CCCM517	AF274274	Saldarriaga et al., 2001
P. noctiluca Murray ex Haeckel	CCMP732	AF022156	Saunders et al., 1997
Pyrophacus steinii (Schiller) Wall & Dale		AY443024	Saldarriaga et al., 2004
Thecadinium dragescoi Balech		AY238479	Hoppenrath et al., 2004
T. inclinatum Balech	ccmp1890	DQ388458	Zhang et al., 2006
T. mucosum Hoppenrath & Taylor	CCMP1890	AY238477	Hoppenrath et al., 2004

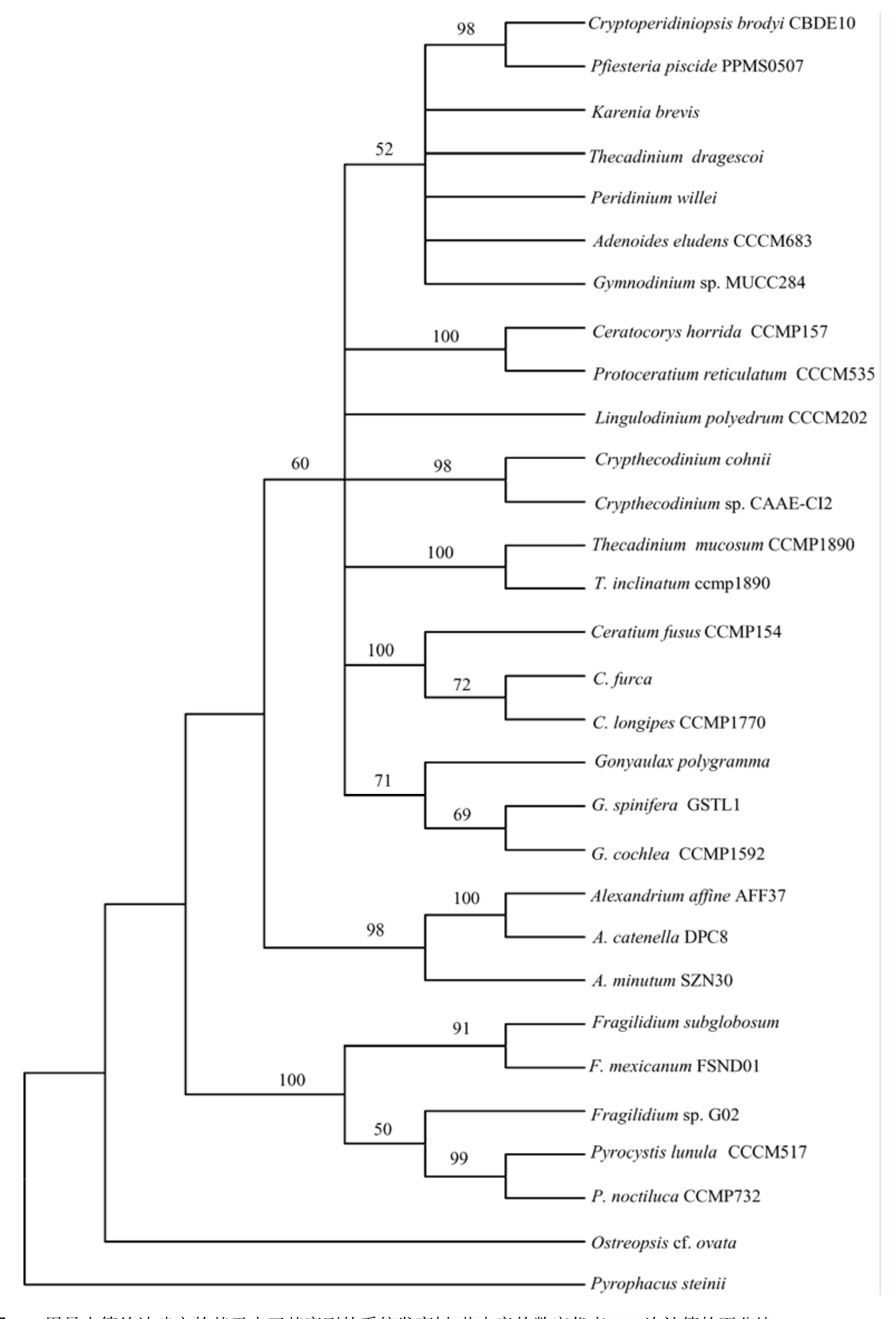


图22 用最大简约法建立的基于小亚基序列的系统发育树(节点旁的数字代表1000次计算的百分比)
Fig. 22. Maximum parsimony consensus tree resolved from SSU-rDNA nucleotide sequences (Numbers next to branching points indicate percentage of 1000 bootstraps).

3　讨论

3.1　形态学

我们在中国东海发现了艄杆藻属和易碎藻属的孢囊, 通过萌发建立了株系, 并对其甲板的排列方式进行了观察, 验证了孢囊的鉴定。墨西哥易碎藻曾经发现于墨西哥湾、地中海和俄罗斯海域(Balech, 1988; Blanco, 1989; Orlova et al., 2004), 我们的发现显示该种有较广的地理分布。艄杆藻属和易碎藻属都是仅包括了少数几个种的类群, 形态学和系统发育的结果显示本文报道的两个未定种不同于以前描述的物种, 说明这两个属下可能还有更多的物种有待描述。由于这两个属的分类学位置仍旧不清楚, 因此今后有必要进行深入的研究。

艄杆藻属最早由Balech于1967年命名, 属名的来源是第一横沟板上有一根很长的刺, Matsuoka等(1990)把艄杆藻属的定义修改为: 细胞为自养型的多甲藻, 第一横沟板上有一根很长的刺, 纵沟板5块, 孢囊圆形、钙质。由于伊玛艄杆藻的发现, 属的特征中孢囊部分修改为有机质和钙质(Kobayashi & Matsuoka, 1995)。甲藻的下壳甲板普遍要比上壳的保守, 而横沟和纵沟的甲板, 包括数量和形状, 又要比下壳的保守, 因此横沟和纵沟在分类学上有重要的意义。Balech (1974)根据横沟板的差异, 把原多甲藻属*Protoperidinium* Bergh从多甲藻属*Peridinium* Ehrenberg中分开, 这两个属具有相近的甲板组成, 但是原多甲藻只有4块横沟板, 其中第一块是很小的t板, 而多甲藻有5–6块横沟板, 没有t板。斯氏藻属、艄杆藻属和五隔藻属*Pentapharsodinium* Indelicato & Loeblich III的甲板组成和多甲藻属也很相近, 区别是后三个属都有t板。斯氏藻属有6块横沟板, 艄杆藻属和五隔藻属却只有5块。艄杆藻属和五隔藻属的区别是前者纵沟板有5块, 并且t板有刺, 而后者的纵沟板只有4块, t板没有刺。t板上的刺不是艄杆藻属所特有的, 锥状斯氏藻的变种*Scrippsiella trochoidea* var. *aciculifera* Montresor也具有类似的刺, 这些变种和锥状斯氏藻在ITS序列上并没有明显的区别, 反而是有些变种之间的ITS序列差异更加明显(D’Onofrio et al., 1999; Gottschling et al., 2005), 这些结果显示横沟板上的刺不是理想的分类学特征, 纵沟板数目的差别可能才是艄杆藻属和五隔藻属最大的区别。

艄杆藻属的定义还有一些不清楚的地方, 这个属的合理性也一直受到质疑, Balech (1967)在描述墨西哥艄杆藻*Ensiculifera mexicanum* Balech的时候, 认为它的横沟板是6块, 并且没有给出拉丁文的描述; 该属正式描述的第一个种——*E. loeblichii*, 其t板并没有刺(Cox & Arnott, 1971), 因此Indelicato和Loeblich III (1986)提议把该种转移到五隔藻属; D’Onofrio等(1999)认为*E. loeblichii*作为艄杆藻属的模式种, 不能被改名。我们发现的艄杆藻在形态和甲板组成上都和伊玛艄杆藻接近, 但是伊玛艄杆藻的sp板和t板直接接触, 而本株的sp板没有, 艄杆藻属的其他两个种——墨西哥艄杆藻和带刺艄杆藻的sp板均没有和第一横沟板直接接触, 这也曾经被认为是艄杆藻属的特征之一(Steidinger & Tangen, 1997), 但是墨西哥艄杆藻和带刺艄杆藻*E. carinata* Matsuoka, Kobayashi & Gains均形成钙质的孢囊, 并且带刺艄杆藻的sp板末端有一根刺, 而本文报道的种类和它们明显不同。

易碎藻属由Balech于1959年命名, 该属的种类具有很薄的甲板, 在外来刺激下容易断裂, 形成一个包围原生质的晕环。至今总共描述了4个海洋种。这些种类可以根据顶孔

复合体和第一沟前板结合的方式分为两类，第一类是通过两条垂直的线连接，这种连接方式也是*Goniodoma* Stein属的特征，墨西哥易碎藻和*F. heterolobum* Balech属于这一类(Balech, 1958, 1988)；第二类是单线连接，这和一些亚历山大属*Alexandrium* Halim的种类(比如*Alexandrium monilatum* (Howell) Balech等)的连接方式一致，半球易碎藻和*F. fissile* Balech属于这一类(Von Stosch, 1969; Balech, 1990)。本文报道的易碎藻(G02)其顶孔复合体和第一沟前板结合的方式属于第二类，并且和半球易碎藻、*F. fissile*的形态、大小都接近，主要的区别是半球易碎藻1″的腹孔是直接坐在前纵沟板上(Von Stosch, 1969)，而易碎藻(G02)1″上的腹孔是一条裂缝末端膨胀形成，*F. fissile*则没有腹孔(Balech, 1990)。

易碎藻属是一类很少被引用的甲藻，但是它们的孢囊却在很多海域发现，比如墨西哥易碎藻的孢囊分布在俄罗斯、西班牙(Blanco, 1989; Orlova et al., 2004)；半球易碎藻的孢囊分布在澳大利亚(Sonneman & Hill, 1997)，美国沿海发现过两种未鉴定的易碎藻孢囊(Owen & Norris, 1985)。此前在东海以及中国其他海域都没有报道过该属的存在，但是我们在沉积物中却发现了较大密度的易碎藻孢囊，显示它们在水体中可能也有一定的密度。在广西北部湾的孢囊研究中曾经发现过类似的孢囊，萌发后得到典型的易碎藻细胞，但误认为亚历山大属的种类(Gu et al., 2003)，该孢囊的萌发孔也是圆形，但面积更大，可能不同于本文报道的种类。由于甲藻通常只在较短的时间内在水体中出现，而大部分时间可能是以孢囊的形式存在于沉积物中，因此研究孢囊的多样性经常会揭示一些新记录的物种(Ellegaard等, 1994; Orlova et al., 2004)，本文的研究结果也证实了这一点。

3.2 系统发育

我们报道了舰杆藻属和易碎藻属3个全新的序列，并利用基因库中已有的序列建立了2株系统发育树。结果表明舰杆藻属和五隔藻属在系统发育树上很难区分开，这和它们形态上的相似性吻合，即具有完全相同的甲板组成，只是在纵沟板的数量上相差一块。而*Ensiculifera loeblichii*在系统发育树上并没有和其他的舰杆藻聚合在一起，由于该种的t板并没有刺，它的纵沟板数目也不是很清楚，如果该种最终证明只有4块纵沟板，那么舰杆藻属和五隔藻属的合并是可预期的。

墨西哥易碎藻、易碎藻(G02)和半球易碎藻在系统发育树上聚合在一起，验证了形态学分类的准确性。易碎藻属和扁甲藻属*Pyrophacus* Stein同属于Pyrophacaceae科，这两个属也是甲藻中仅有的两个横沟板超过9块的门类，但是在系统发育树上它们并没有聚合在一起。相反，易碎藻属的种类和梨甲藻属的种类组成了一个支持度达到100%的类群，梨甲藻属*Pyrocystis* Murray ex Haeckel是一类特殊的甲藻，它只有在配子阶段才会表现出和亚历山大属的种类完全一样的甲板方程式，但是它却和形态差异很大的易碎藻属聚合在一起，这种系统发育和形态学不一致的情况还出现在裸甲藻属的种类上(Daugbjerg et al., 2000)，由于现有的梨甲藻属和易碎藻属序列还很少，目前我们难以得出一个合理的结论。

致谢 感谢厦门大学生物系谢文玲博士提供沉积物样品，国家海洋局第三海洋研究所杨宁硕士在分子生物学实验上提供了帮助。

参 考 文 献

Anderson D M, Taylor C D, Armbrust E V. 1987. The effects of darkness and anaerobiosis on dinoflagellate cyst germination. Limnology and Oceanography 32: 340–351.

Balech E. 1959. Two new genera of dinoflagellates from California. Biological Bulletin 116: 195–203.

Balech E. 1967. Dinoflagelados Nuevos o interesantes del golfo de Mexico y Caribe. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. Hidrobiología 2: 77–126.

Balech E. 1974. El genero Protoperidinium Bergh, 1881 (Peridinium Ehrenberg, 1931, partim). Museo Argentino de ciencias natureales “Bernadino Rivadavia” e Instituto nacional de investingacion de las ciencias natureales, Revista. Hidrobiologia 4: 1–79.

Balech E. 1988. Una especie nueva del genero *Fragilidium* (Dinoflagellata) de la bahia de Chamela, Jalisco, Mexico. Anales del Instituto Biologica UNAM, Series Zoologica 58: 479–486.

Balech E. 1990. Four new dinoflagellates. Helgolander Meeresuntersuchungen 44: 387–396.

Blanco J. 1989. Quistes de Dinoflagelados de las costas de Galicia. I. Dinoflagelados gonyaulacoides. Scientia Marina 53: 785–796.

Cho H J, Matsuoka K. 2001. Distribution of dinoflagellate cysts in surface sediments from the Yellow Sea and East China Sea. Marine Micropaleontology 42: 103–123.

Cox E R, Arnott H J. 1971. The ultrastructure of the theca of the marine dinoflagellate, *Ensiculifera loeblichii* sp. nov. In: Parker B C, Brown R M eds. Contributions in Phycology. Lawrence, Kansas: Allen Press. 121–136.

Daugbjerg N, Hansen G, Larsen J, Moestrup O. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. Phycologia 39: 302–317.

D’Onofrio G, Marino D, Blanco L, Busico E, Montresor M. 1999. Toward an assessment on the taxonomy of dinoflagellates that produce calcareous cysts (Calciodinelloideae, Dinophyceae): A morphological and molecular approach. Journal of Phycology 35: 1063–1078.

Ellegaard M, Charistensen N F, Moestrup O. 1994. Dinoflagellate cysts from recent Danish marine sediments. European Journal of Phycology 29: 183–194.

Fensome R A, Taylor F J R, Norris G, Sarjeant W A S, Waharton D I, Williams G L. 1993. A classification of living and fossil dinoflagellates. Micropaleontology Special Publication 7: 1–351.

Figueroa R I, Bravo I. 2005. Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. Journal of Phycology 41: 370–379.

Fritz L, Triemer R E. 1985. A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. Journal of Phycology 21: 662–664.

Gottschling M, Keupp H, Plotner J, Knop R, Willems H, Kirsch M. 2005. Phylogeny of calcareous dinoflagellates as inferred from ITS and ribosomal sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 36: 444–455.

Gu H, Fang Q, Sun J, Lan D, Cai F, Gao Z. 2003. Distribution of dinoflagellate cysts in recent sediment from Guangxi, P. R. China. Acta Oceanologica Sinica 22: 407–419.

Gu H-F (顾海峰), Fang Qi (方琦), Li R-X (李瑞香), Lan D-Z (蓝东兆), Zhu M-Y (朱明远). 2004. Preliminary study on dinoflagellate cysts at the Estuary of Changjiang River. Oceanologia et Limnologia Sinica (海洋与湖沼) 35: 413–422.

Guillard R R L, Ryther J H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal Microbiology 8: 229–239.

Indelicato S R, Loeblich III A R. 1986. A revision of the marine peridinioid genera (Pyrrhophyta) utilizing hypothecal-cingular plate relationships as a taxonomic guideline. Japanese Journal of Phycology 34: 153–162.

Kobayashi S, Matsuoka K. 1995. A new species of *Ensiculifera*, *E. imariense* (Dinophyceae), producing organic-walled cysts. Journal of Phycology 31: 147–152.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Bioinformatics 5: 150–163.

Meier K J S, Janofske D, Willems H. 2002. New calcareous dinoflagellates (Calciodinelloideae) from the Mediterranean Sea. Journal of Phycology 38: 602–615.

Matsuoka K, Kobayashi S, Gains G. 1990. A new species of the genus *Ensiculifera* (Dinophyceae), its cyst and motile forms. Bulletin of Plankton Society of Japan 37: 127–143.

Montresor M, Janofske D, Willems H. 1997. The cyst-theca relationship in *Calciodinellum operosum* emend. (peridiniales, dinophyceae) and a new approach for the study of calcareous cyst. Journal of Phycology 33: 122–131.

Orlova T Y, Morozova T V, Gribble K E, Kulis D M, Anderson D M. 2004. Dinoflagellate cysts in recent marine sediments from the east coast of Russia. Botanica Marina 47: 184–201.

Owen K C, Norris D R. 1985. Cysts and life cycle considerations of the thecate dinoflagellate *Fragilidium.* Journal of Coastal Research 1: 263–266.

Qi Y Z, Hong Y, Anderson D. 1996. Dinoflagellate cysts from recent marine sediments of the South and East China Sea. Asian Marine Biology 13: 87–103.

Sonneman J A, Hill D R A. 1997. A taxonomic survey of cyst-producing dinoflagellates from recent sediment of Victorian coastal waters, Australia. Botanica Marina 40: 149–177.

Steidinger K A, Tangen K. 1997. Dinoflagellates. In: Tomas C R ed. Identifying Marine Phytoplankton. San Diego: Academic Press. 387–584.

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876–4882.

Von Stosch H. 1969. Dinoflagellaten aus der Nordsee II. *Helgolandinium subglobosum* gen. et spec. nov. Helgoländer Wiss. Meeresunters 19: 569–577.

White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninskv J J, White T J eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. San Diego: Academic Press. 315–322.

Wang Z-H (王朝晖), Qi Y-Z (齐雨藻). 2003. Distribution of dinoflagellate resting cysts in surface sediments from the Changjiang River estuary. Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报) 14: 1039–1043.